

Leucosep 管

添付文書
体外診断用医薬品

取扱説明書

用途

Leucosep 管の使用目的は全血から PBMC を収集、分離することである。ELISPOT 検査をするために従来 FICOLL-PAQUE* PLUS を用いて PBMC を分離するが、媒体が充填された Leucosep 管を使用することで PBMC の分離をより容易に行うことができる。

概要

ELISPOT 検査は、全血から分離された PBMC 中の T 細胞を用いる。PBMC を分離する方法の 1 つとして FICOLL-PAQUE PLUS が用いられるが、数々の慎重を要する作業工程を行わなければならない。一方で Leucosep 管を使用した場合は、FICOLL-PAQUE PLUS を使用した場合より容易に、かつ作業処理も安定して細胞分離を行うことが可能となる。また作業に要する時間も短縮される。

原理

Leucosep 管は、密度勾配遠心法を用いて、ヒト全血から PBMC を最適に分離するために開発された。Leucosep 管は、透明のポリプロピレン製チューブに多孔性フィルターがはめ込まれている管である。多孔性フィルターは生物学的に無害であり、高純度ポリエチレンで構成されている。Leucosep 管を使用すると、FICOLL-PAQUE PLUS を使用して PBMC を分離する方法よりも短時間で作業ができ、かつ慎重に FICOLL-PAQUE PLUS 上に血液を重層する必要がなくなる。従って抗凝固処理を施した全血を細胞培地で希釈した後、直接 Leucosep 管に注ぐことが可能である。この際、多孔性フィルターがあるので注ぎ込まれた血液と FICOLL-PAQUE PLUS が混ざることはない。遠心分離中に、比重差により、PBMC が赤血球から分離され、FICOLL-PAQUE PLUS の界面に収集される。また、遠心分離が完了した後も、多孔性フィルターがあるため PBMC 層が赤血球と混ざることはない。

注意

1. 本品は体外診断用であり、それ以外の用途に使用しない。
2. 使用は専門者に限る。操作者は Leucosep 管の取り扱いを十分に習得する。
3. ヒト血液由来物質を取扱う際は十分注意し、血液検体は感染の可能性があるものとして取扱う。
4. 血液検体および構成試薬の取り扱い・保管・廃棄は各国、各市町村の規制に従う。
5. ピペット操作、洗浄法、遠心時間および/または温度が、推奨方法から逸脱すると、PBMC 分離の純度が落ち、その後の検査結果に影響が生じる可能性がある。
6. CPT 管 (CPT™、Becton Dickinson) または EDTA 採血管は、Leucosep 管と互換性がないため、CPT 管または EDTA 管を用いて採血をしない。
7. 血液検体を冷蔵または冷凍保存しないこと。血液検体を保管または実験室へ移送する

際には、18～25°C、あるいは T-Cell *Xtend*®試薬を使用する場合は 10～25°C の間の温度を保つ。

8. 血液を 8 時間以上、あるいは T-Cell *Xtend*®試薬を使用する場合は 32 時間以上保管しない。
9. 採血管を再使用しない。
10. 使用期限を過ぎた場合は使用しない。
11. 無菌操作にて本製品を使用する。
12. 直射日光を避けて保管する。
13. Leucosep 管が破損している、FICOLL-PAQUE PLUS がはっきりと黄色に変色している、または粒状物質が見られる場合は使用してはならない。

梱包内容

FICOLL-PAQUE PLUS が既に充填済みの Leucosep 管、50 本

保管および安定性

未開封時は 4～30°C で保管し、箱に記載された期限まで使用が可能。開封後は直射日光を避け、室温（18～25°C）で保管する。外装開封から 12 週間以内または箱に記載された期限のどちらか早い方までに使用する。

Leucosep 管以外に PBMC の分離のために必要となる器具・器材

1. ヘパリン加採血管
2. AIM V®および RPMI 細胞培地
3. 15 mL 遠心分離管
4. 最低1000 RCF (g) でPBMCを分離し、室温（18～25°C）で検体を保持できる遠心分離機
5. バイオセーフティレベル 2 (BL2) キャビネット (推奨)
6. ピペットおよび滅菌済みピペットチップ
7. ELISPOT キット
8. 採血後 8 時間以上経過した血液検体を使用する場合は、T-Cell *Xtend*®試薬が必要になる。

使用手順

注：以下の手順は、Good Laboratory Practice（優良試験所規範）の原則に従って行う。

1. 使用前に、必要数の Leucosep 管を室温（18～25°C）に戻す。
2. FICOLL-PAQUE PLUS が多孔性フィルターよりも上部にある場合は 350×g で 1 分間遠心分離機にかけ、FICOLL-PAQUE PLUS を多孔性フィルターより下部に落とす。

3. 血液検体を転倒混和させてから、15 mL 遠心分離管を用いて血液 5 に対して AIM V または RPMI 細胞培地 3 の比率で血液検体を希釈する。遠心分離管を転倒混和させ、血液と細胞培地を混合する。
4. 希釈した血液を Leucosep 管に直接流し入れ、18~25°C、1000 ×g で 10 分間遠心分離をする。
5. 遠心分離後、白濁色の PBMC 層を新しい 15 mL 遠心分離管に移す。AIM V または RPMI を総量が 10mL になるまで加え転倒混合する。
6. 600 ×g で 7 分間遠心分離する。遠心分離後、上清を捨てる。
7. 沈殿物を AIM V または RPMI で再懸濁し、10mL になるまで AIM V または RPMI を加え、350 ×g でさらに 7 分間遠心分離をする。
8. 遠心分離後、上清を捨て ELISPOT 検査に必要な量の AIM V (RPMI は不可) で沈殿物を再懸濁する。
9. ELISPOT 検査にて細胞を抗原刺激する場合は、必要量に応じて AIM V (RPMI は不可) で細胞を希釈する。

制限事項

他の分離方法と同様に、Leucosep管を使用すると、一部のPBMCのサブセット（T細胞、B細胞など）の比率が全血と比較して異なる場合がある。しかし通常の検査では、これらのサブセットの比率の違いは検査に影響を及ぼさない。

精度管理

社内試験にて、FICOLL- PAQUE PLUS と Leucosep 管を用いた場合を比較したところ、PBMC 収量が大幅に減少することは見られなかった。各施設における精度管理の一環として、関連する検査をする際に十分な PBMC を得られるよう細胞計数装置の設定および検証をすること。さらに、精度管理用に、検査上で想定される T 細胞の機能を確認するため、陽性コントロールと陰性コントロールを使用しなければならない。

性能

T-Cell Xtend 試薬を用いて採血後時間経過した血液を取り扱った場合

46 人のドナーから 6 mL の血液検体を 2 本ずつ採取した。1 本目は、採血から 8 時間以内に手作業で FICOLL* 上に重層し処理をした。2 本目の検体は、29~32 時間経過した後、T-Cell Xtend 試薬を加え Leucosep 管を使用して細胞分離を行った。

どちらの方法でも、ELISPOT 検査を行うのに十分な細胞数が確保され、両検体から得られた細胞は検査に有効な細胞であった。

新鮮な血液を取り扱った場合










52 人のドナーから 6 mL の血液検体を 2 本ずつ採取した。各ドナーから採取された両検体を採血から 8 時間以内に処理した。1 本目の検体は、手作業で FICOLL 上に重層して細胞分離を行った。2 本目の検体は、Leucosep 管を使用して処理した。

どちらの方法でも、ELISPOT 検査を行うのに十分な細胞数が確保され、両検体から得られた細胞は、検査に有効な細胞であった。

ELISPOT 検査用 PBMC の収集・分離におけるトラブルシューティング

問題	考えられる原因	解決方法
細胞数が少ない	<p>ドナーが白血球減少症である</p> <p>不適切な採血管の使用</p> <p>採血管が室温 (18~25°C) で保管されていない</p> <p>血液が適切温度で保管されていない</p> <p>推奨される量または希釈率が用いられていない</p>	<p>採血管をもう 1 本加え、血液量を増やす</p> <p>CPT および EDTA が含まれる採血管は、Leucosep 管と互換性がない</p> <p>採血管を室温に戻す</p> <p>血液は、18~25°C、あるいは T-Cell <i>Xtend</i> 試薬を使用する場合は 10~25°C で移送する</p> <p>正しい手順に従う</p>
赤血球が混入している	<p>適切な温度で血液が保管されていない</p> <p>採血管を室温 (18~25°C) で保管していない</p> <p>血液が希釈されていない</p> <p>Leucosep 管内で血液検体が傾いている</p> <p>遠心分離が不適切</p> <p>血液検体の分離が不十分</p>	<p>血液は、18~25°C、あるいは T-Cell <i>Xtend</i> 試薬を使用する場合は 10~25°C で移送する</p> <p>採血管を室温に戻す</p> <p>手順に従って、血液を希釈する</p> <p>遠心分離機に Leucosep 管が直立しているよう確認する</p> <p>遠心分離の手順に従う</p> <p>遠心分離機に 18~25°C の冷却機能があるか確認する</p> <p>遠心ブレーキのスイッチがオフになっていることを確認する</p> <p>遠心分離時間を 10 分間延長する</p>
明確な PBMC 層がない	<p>血液検体の分離が不完全</p> <p>遠心分離機が適切に校正されていない</p> <p>遠心分離が不適切</p> <p>ドナーが高脂血症である</p>	<p>遠心分離時間を 10 分間延長する</p> <p>遠心分離機を校正する</p> <p>遠心分離の手順に従う</p> <p>空腹時に血液を採取する</p>
無効な結果	<p>様々な不適切な検体取扱いによって、無効な結果が得られる場合がある</p>	<p>上記の各セクションを参照</p>

記号の解説

	使用期限 (年/月/日)
	ロット番号
	カタログ番号
	注意：取扱説明書を参照
	製造者
	「n」試験に十分
	インビトロ診断機器
	保管温度制限
	取扱説明書を参照

T-Cell *Xtend* のロゴは、Oxford Immunotec Limited の商標です。AIM V は、Invitrogen の商標です。

CPT は、Becton Dickinson の商標です。

*FICOLL と FICOLL-PAQUE は、GE Companies の商標です。

T-Cell *Xtend* 試薬は、以下の特許および出願中の特許によって保護されています。
EP2084508、US13/253,598、CN101529221、AU2007-303994、JP2009-530943、
IN2165/DELNP/2009、CA2665205。

The use of the T-Cell *Xtend* reagent is protected by the following patents and patents pending; EP2084508; US13/253,598, CN101529221, AU2007-303994, JP2009-530943, IN2165/DELNP/2009, CA2665205.

© Oxford Immunotec Limited, 2022. All rights reserved.

製造者：

Oxford Immunotec Limited
143 Park Drive, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4SE, UK
+44(0)1235 442780
www.oxfordimmunotec.com

PI-LT.615-JP-V5